Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg.

Zur Pharmakologie des Harnstoffs IX.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

Zahnheilkunde

der

Hohen Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Karl-Ferdinand Hoffmann
approb. Zahnarzt aus Stargard in Pommern.

Marburg 1933

Buchdruckerei Joh. Hamel, Marburg-Lahn

Angenommen von der Medizinischen Fakultät Marburg
am 15. Dezember 1932.

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

Referent: Professor Dr. Baur.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Aus den Versuchen von *Mißfeld* 1), *Fries* 2), *Hermelingmeier* 3), *Kroeplin* 4), *Bakker* 5) und *Lorentz* 6) hatte sich gezeigt, daß unter gewissen Bedingungen der Harnstoff eine Durchlässigkeitsvermehrung bewirken kann, und daß Stoffe, die normalerweise nicht permeieren, unter der Wirkung von Harnstoff resorbiert werden. Eine inzwischen von *Fatheuer* 7) durchgeführte Arbeit ergab, daß auch an sich Farbstoffe, die normalerweise aufgenommen werden, in der Regel durch Harnstoff vermehrt aufgenommen werden. Nach den Versuchen von *Utz* 8) und *Dellen* 9) geht die Durchlässigkeitssteigerung unter Umständen so weit, daß die Schwellenkonzentration von Giften wesentlich geändert werden kann. Die Versuche von *Dellen* und *Utz* sind mit Strychnin durchgeführt worden, also mit einem Gift, das spezifisch im Rückenmark verankert wird.

Im Hinblick auf das Gesamtproblem der Urämie und speziell im Zusammenhang mit zur Zeit laufenden Versuchen von *Baur* und *Schumann* 10) über die Veränderung der Blutliquorschranke unter Harnstoff, untersuchte ich auf Veranlassung von Professor *Baur* die Speicherung und Anfärbbarkeit des Gehirns durch Farbstoffe mit und ohne Harnstoffzusatz.

a) Versuche an Warmblütern (Mäuse).

Es wurden saure und basische Farbstoffe verwendet. In der Hauptsache erfolgte aber die Auswahl nach dem Vermögen der Farbstoffe Nervenzellen anzufärben, und zwar wurden die Angaben aus der Literatur entnommen.

Die Farbstoffe kamen in 0,2 % Tyrodelösung zur Anwendung und zwar wurden die Lösungen subkutan, in einzelnen Versuchsreihen intraperitoneal und in anderen intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die Harnstofftiere bekamen dieselben Mengen mit dem Unterschied, daß die entsprechenden Farbstofflösungen 5 % Harnstoff enthielten. In manchen Versuchen erfolgte in gewissen Zeitabschnitten nach der Injektion der Farbstoffe noch besondere

Harnstoffinjektionen. Es wurden stets die zu einander gehörigen Tiere eines Versuches nach gleichen Zeiten getötet, Gehirn und Rückenmark herausgenommen, die Zeiten aber in den einzelnen Versuchen variiert. Nach Feststellung des makroskopischen Befundes wurden Zupf- und Quetschpräparate hergestellt, die unter dem Mikroskop betrachtet wurden. Der Rest des Materials kam in 8% Formalinlösung zur Aufbewahrung.

Methylenblau.

Die in der Tabelle 1a—1c zusammengestellen Versuche zeigen die Befunde mit diesem neurotropen Farbstoff. Die bei subkutaner Injektion erhaltenen Resultate sind in der folgenden Tabelle 1 a (S. 5) zusammengestellt.

Im Gegensatz zu früheren unveröffentlichten Versuchen von *Baur* mit Trypanblau, wo schon makroskopisch unter der Wirkung des Harnstoffs ein außerordentlich deutlicher Unterschied aufgetreten war mit einer intensiveren Färbung des Harnstofftieres, zeigen die vorstehenden Versuche mit Methylenblau, daß keinerlei größere Unterschiede auftreten. Auch die Färbung des Gehirns bei makroskopischer Betrachtung war an sich schwach und ließ keinen Einfluß des Harnstoffs erkennen, sodaß auf mikroskopische Untersuchung von vornherein verzichtet werden konnte.

Dasselbe Resultat ergaben Versuchsreihen bei intraperitonealer Einverleibung des Farbstoffs. (Tabelle 1 b S. 6).

Bei intravenöser Einspritzung des Farbstoffs änderte sich das Bild, was die Versuchsreihen der Tabelle 1 c (S. 7) zeigen.

Wir sehen, daß unter 9 Versuchen 6 positiv ausfielen, indem die Harnstofftiere schon makroskopisch eine stärkere Blaufärbung aufwiesen. Auch das Gehirn dieser Tiere war intensiv blau und bei makroskopischer Betrachtung deutlich stärker angefärbt als die Kontrolltiere. Gleichzeitig zeigt die Tabelle den Einfluß der Zeit. Bei den 3 negativ verlaufenen Versuchen waren die Tiere nach 20 Minuten getötet worden, während bei den stärker angefärbten Tieren zwischen Injektion und Tötung Zeiten lagen, die zwischen 1 und 5 Stunden schwankten.

Miskroskopisch konnte nun der Befund nicht erhärtet werden. Bei den Krontrolltieren wie auch bei den Harnstofftieren fanden sich keine Unterschiede in den Gehirnen, selbst da, wo makroskopisch

Tabelle 1 a.

Methylenblau[1]).

(Subkutane Injektion des Farbstoffs).

Versuch Nr.	Gew. in g	Farbstoffmenge i. ccm mit u. ohne Harnstoff	Maus getötet nach	Makros. Färbung der Maus	Makroskop. Färbung des Gehirns
9	13.0	0.65	2 Std.	wenig gefärbt	s. wenig gefärbt
9a	13.5	0.67+5 % H.	2 Std.	wenig gefärbt	s. wenig gefärbt
10	11.5	0.55	4 Std.	wenig gefärbt	s. wenig gefärbt
10a	13.0	0.65+5 % H.	4 Std.	wenig gefärbt	wenig aber stärker als 10 gefärbt
11	13.0	0.65	6 Std.	s. wenig gefärbt	s. wenig gefärbt
11a	12.0	0.60+5 % H.	6 Std.	stärker gefärbt	stärker gefärbt als 11
19	12.0	0.60	2 Std.	stärker gefärbt	stärker gefärbt als 19a
19a	12.0	0.60+5 % H.	2 Std.	wenig gefärbt	wenig gefärbt
21	22.0	1.1	1 Std.	schwach gefärbt	schwach gefärbt
21a	13.0	0.65+5 % H.	1 Std.	schwach gefärbt	schwach gefärbt
31	13.0	0.65	2 Std.	schwach gefärbt	s. schwach gefärbt
31a	22.0	1.1 +5 % H.	2 Std.	schwach gefärbt	s. schwach gefärbt
39	22.0	1.1	1 Std.	s. schwach gefärbt	s. schwach gefärbt
39a	13.0	0.65+5 %	1 Std.	sehr schwach gefärbt	s. schwach gefärbt

[1]) 0,2% Methylenblau in Tyrodelösung.

Tabelle 1 b.
Methylenblau[1]).
(intraperitoneale Injektion des Farbstoff).

Versuch Nr.	Gew. in g	Farbstoffmenge in ccm mit u. ohne Harnstoff	Maus getötet nach	Makroskop. Färbung der Maus	Makroskop. Färbung des Gehirns
23	12.5	0.63	2 Std.	gefärbt	schwach gefärbt
23 a	13.0	0.65+5 % H.	2 Std.	gefärbt	schwach gefärbt
25	14.0	0.70	1 Std.	gefärbt	schwach gefärbt
25 a	15.0	0.75+5 % H.	1 Std.	gefärbt	schwach gefärbt
33	13.0	0.65	1 Std.	stark gefärbt	stärker als 33 a gefärbt
33 a	13.0	0.65+5 % H.	1 Sdt.	schwach gefärbt	schwach gefärbt

die Differenzen außerordentlich deutlich waren. Es erwies sich als sehr schwierig, bei Zupf- und Quetschpräparaten die Farbschicht mikroskopisch sichtbar zu machen; auch eine Reihe von Hilfsmitteln führten nicht zu einer deutlichen Differenzierung. Es handelte sich bei Methylenblau teilweise um eine diffuse Durchdringung, wobei der makroskopisch festgestellte Befund bei den Zupf- und Quetschpräparaten des Gehirns deutlich erhalten blieb, wenn diese Präparate ohne optische Hilfsmittel einfach gegen das Licht gehalten wurden.

Neben der diffusen allgemeinen Färbung der meisten Tiere, also auch der Kontrolltiere, fanden wir vereinzelt tiefblau gefärbte Punkte und kleine Körnchen in den Zellen des Gehirns, wahrscheinlich gefärbte Kerne; diese waren reichlicher in den äußeren Partieen des Gehirns. Beim Durchschneiden sind die Schnittflächen meist ziemlich farblos, sie werden aber dann beim Liegen an der Luft deutlich blau. Aber auch diese Zellen traten bei den Harnstofftieren nicht so vermehrt auf, als daß sich hieraus mikroskopisch ein anderes Bild ergeben hätte.

[1]) 0,2% Methylenblau in Tyrodelösung.

Tabelle 1 c.

Methylenblau[1]).

(Intravenöse Injektion des Farbstoffes).

Versuch Nr.	Gew. in g	Farbstoffmenge i. ccm m. u. ohne Harnstoff	Maus getötet nach	Makroskop. Färbung der Maus	Makroskop. Färbung des Gehirns
35	16.0	0.40	2 Std.	gefärbt	schwach gefärbt
35a	17.0	0.43+5 % H.	2 Std.	gefärbt	etw. stärker als 35 gefärbt
37	19.0	0.48	1 Std.	schwach gefärbt	schwach gefärbt
37a	20.0	0.50+5 %	1 Std.	schwach gefärbt	schw. gef., aber stärker als 37.
49	17.0	0.43	20 Min.		gefärbt
49a	16.0	0.40+5 % H.	20 Min.		gefärbt
55	11.0	0.30	20 Min.	schwach gefärbt	stark gefärbt
55a	18.0	0.45+5 %	20 Min.	schwach gefärbt	stark gefärbt
59	18.0	0.45	20 Min.	schwach gefärbt	gefärbt
59a	17.0	0.43+5 % H.	20 Min.	schwach gefärbt	schwach gefärbt
15	23.0	0.58	2 Std.	schwach gefärbt	sehr schwach gefärbt
15a	23.0	0.58+5 % H.	2 Std.	stärker gefärbt	deutl. stärker gef. als 15
17	17.0	0.43	1 Std.	gefärbt	gefärbt
17a	19.0	0.48+5 % H.	1 Std.	gefärbt	stärker gefärbt als 17
27	21.5	0.55	2 Std.	s. schwach gefärbt	sehr schwach gefärbt
27a	22.0	0.55+5 % H.	2 Std.	schwach gefärbt	schwach, aber stärk. als 27 gef.
29	19.5	0.48	5 Std.	gefärbt	schwach gefärbt
29a	15.5	0.38+5 %	5 Std.	gefärbt	stärker gefärbt als 29

[1]) Intravenöse Injektion von 0.2 % Methylenblau in Tyrodelösung.

Bei Methylenblau konnten wir also mit Sicherheit feststellen, daß bei Einhalten einer gewissen Zeit unter Harnstoffzusatz eine intensivere Farbdurchdrängung des Gehirns stattfindet, ein Befund, der allerdings bei mikroskopischer Betrachtung nicht deutlich in Erscheinung trat.

Makroskopische Färbung der Maus: Leber, Milz und Magen fast farblos, Niere äußerlich ebenfalls beinahe farblos, im Durchschnitt ist die Rinde makroskopisch ungefärbt, das Mark schwarz-blau.

Auf Grund der Erfahrungen mit Methylenblau verzichteten wir bei den nachfolgenden Farbstoffversuchen auf die intraperitoneale und subkutane Einverleibung und injizierten den Farbstoff intravenös.

Tabelle 2.
Neutralrot[1]).

Versuch Nr.	Gew. in g	Farbstoffmenge in ccm mit u. ohne Harnstoff	Maus getötet nach	Makroskop. Färbung der Maus	Makroskop. Färbung des Gehirns
41	15.0	0.38	3 Std.	schwach gefärbt	schwach gefärbt
41 a	13.0	0.33+5 % H.	3 Std.	schwach gefärbt	schwach gefärbt
44	14.0	0.35	2 Std.	gefärbt	gefärbt
44 a	14.0	0.35+5 % H.	2 Std.	gefärbt	deutlich gefärbt
50	14.0	0.35	20 Min.	stärker gefärbt	gefärbt
50 a	11.0	0.30+5 % H.	20 Min.	schwach gefärbt	etwas stärker als 50 gefärbt
77	17.0	0.85	1 Std. 30 Min.	gefärbt	gefärbt
77 a	18.0	0.85+5 % H.	1 Std. 30 Min.	gefärbt	gefärbt
84	17.0	0.43+2 % H.	30 Min.		stark gefärbt
84 a	16.0	0.40	30 Min.		gefärbt

[1]) 0,2% Neutralrot in Tyrodelösung.

Neutralrot.

Die Tabelle 2 zeigt die Resultate der Versuche mit Neutralrot. Makroskopisch trat unter 5 Versuchen nur bei 2 eine etwas stärkere Färbung des Gehirns bei den Harnstofftieren zutage. Bei 3 Versuchen konnte kein Unterschied festgestellt werden. Auch in dieser Versuchsreihe ließen sich die makroskopisch positiven Befunde mikroskopisch nicht erhärten.

Wir fanden den Farbstoff in Form von kleinen roten Körnchen und zwar in der Hauptsache längs der Gefäße. Aber auch eine diffuse Färbung des Gehirns konnten wir feststellen.

Makroskopische Färbung der Maus: Muskulatur gelb, Magen und Darm etwas gefärbt, in Leber und Niere macht es den Eindrück, als ob noch etwas Farbstoff abgelagert wäre.

Pyrrholblau.

Bei sämtlichen Versuchen mit Pyrrholblau, auch bei den Harnstofftieren, erwies sich makroskopisch das Gehirn nicht gefärbt. Mikroskopisch fanden wir sowohl bei den Normaltieren als auch bei den Harnstofftieren einzelne Zellen gefärbt. Die gefärbten Zellen markierten sich als dunkelblaue Punkte, umgeben von einem helleren Hof. Zahlenmäßig ließ sich kein Unterschied unter der Wirkung des Harnstoffs nachweisen. Also eine Wirkung des Harnstoffs im Sinne einer verstärkten Färbung ist nicht nachzuweisen.

Tabelle 3.
Pyrrholblau.
Intravenöse Injektion von 0,2%.

Versuch Nr.	Gew. in g	Farbstoffmenge in ccm mit u. ohne Harnstoff	Maus getötet nach	Makroskop. Färbung der Maus	Makroskop. Färbung des Gehirns
105	21.0	1.05+5% H.	1 Std. 20 Min.	farblos	farblos [1])
105a	21.0	1.05	1 Std. 20 Min.	farblos	farblos [1])
108	19.0	0.95+5% H.	1 Std. 30 Min.	farblos	farblos [1])
108a	19.0	0.95	1 Std. 30 Min.	farblos	farblos [1])

[1]) Bei allen Tieren im Gehirn einzelne gefärbte Zellen nachweisbar. Makroskopisch erscheint das Tier vollkommen farblos, nur die Leber ist grünlich.

Bei Fluoresccin-Natrium ergab sich ein gegenteiliges Bild. Während die Kontrolltiere makroskopisch eine deutliche diffuse Färbung des Gehirns aufwiesen, zeigte das Harnstofftier keinerlei mikroskopische Färbung. Aber auch bei den Kontrolltieren ließ sich mikroskopisch keine Farbe nachweisen.

Tabelle 4.
Fluoresccin-Natrium.

Versuch Nr.	Gew. in g	Farbstoffmenge in ccm mit u. ohne Harnstoff	Maus getötet nach	Makroskop. Färbung der Maus	Mikroskop. Färbung des Gehirns
128	19.0	0.48	10 Min.	schwach	farblos
128a[1]	21.0	0.50	10 Min.	stark	farblos[2])
128b[1]	19.0 +5% H	0.48	10 Min.	stark	farblos

Versuche mit Bismarckbraun zeigten makroskopische Färbung des Gehirns, mikroskopisch nichts. Unterschiede zwischen Harnstofftieren und Normaltieren waren nicht festzustellen.

Weitere Versuche mit Eosin, Cyanol, Trypanblau, Alizarinsulfosäure und Alizarinblau S verliefen gänzlich negativ. Es konnte auch makroskopisch niemals eine Anfärbung des Gehirns festgestellt werden.

Die ersten Versuche von *Dellen* hatten ergeben, daß unter gewissen Bedingungen die Harnstoffwirkung sich auch als Auswaschwirkung geltend machen kann. Die vorstehenden Mäuseversuche hatten z. T. eine positive Antwort auf die gestellte Frage ergeben. Allerdings nicht in dem Maße, wie wir es erwartet hatten. Das konnte nun einerseits an dieser Auswaschwirkung des Harnstoffes liegen, andererseits an der zeitlich kurzen Einwirkungsmöglichkeit des Harnstoffs oder aber auch an der Ungeeignetheit der verwendeten Farbstoffe. Im Hinblick auf die pathologischen Verhältnisse bei der Urämie, wo lange Zeit ein erhöhter Harnstoffspiegel vorhanden ist, schien es uns wünschens-

[1]) Bei Nr. 128a und 128b wurde statt 0,2% 10% Fluoresccin-Na intravenös injiziert.

[2]) Makroskopisch zeigen die Kontrolltiere eine Färbung des Gehirns. Muskulatur erscheint gelblich, Niere enthält deutlich Farbstoff, Leber erscheint farblos.

wert, die Versuchsbedingungen zu ändern und Durchströmungen anzustellen.

Da Durchströmungen des Zentralnervensystems von Warmblütern außerordentlich schwierig durchzuführen sind, verwandten wir zu den nachfolgenden Versuchen Frösche.

b. Versuche an Kaltblütern (Frösche).

Zur Technik sei bemerkt, daß männliche und weibliche Eskulenten und Temporarien verwendet wurden, und zwar wurde gleiches Geschlecht und gleiche Art in den zu gegenüberstellenden Versuchen benutzt. Der Einfachheit halber wurden zu den einzelnen Versuchen nur Frösche verwendet, die nicht mehr als 2 g in ihren Gewichten differierten. Da wir stets mit 100 ccm Farblösung durchströmten, in den zu vergleichenden Versuchen Tiere gleichen Gewichtes aber verwendeten, hatten wir gleichzeitig eine uns erwünschte Variation in Bezug auf die Farbstoffmenge. Die Farbstoffkonzentrationen waren 0.02 und 0.04 %, sie sind in den jeweiligen Tabellen angegeben. Wir führten immer 2 Durchströmungen gleichzeitig aus, und zwar wurde der einen Farbstofflösung ein Harnstoffzusatz von 1 % zugefügt. Bei den Versuchen wurde darauf geachtet, daß in gleichen Zeiten immer gleiche Mengen Farbstofflösung durch die Tiere strömten.

Die Tiere wurden zuerst mit Curare behandelt, (10 g Frosch — 0,1 ccm einer 0,1 % Curare-Ringerlösung), und wenn die Lähmung eingetreten war, wurde die Vena abdominalis durchschnitten und in das zum Herzen hinführende Ende eine Kanüle eingebunden. Dann wurde der Frosch mittels Durchströmung von Ringerlösung blutfrei gemacht und dann mit der Farbstoffdurchströmung begonnen. In einzelnen Versuchen wurde im Anschluß an die Farbstoffdurchströmung nochmals eine Durchspülung von 50 ccm Ringerlösung vorgenommen.

Die mikroskopischen Präparate wurden auf folgende Art hergestellt: Das herauspräparierte Gehirn und ein Teil des Rückenmarkes wurde längere Zeit in Formalinlösung gebracht. Nach einer Wässerung von 6 Stunden wurde es für 12 Stunden in weiche Gelatine eingebettet, dann 12 Stunden in harte Gelatine und zuletzt mit dem Gefriermikrotom in einer Schicht von 10 μ geschnitten und in Glycerin aufgehoben.

Der Einfachheit halber sind die ausgeführten Durchströmungen in Tabellenform wiedergegeben.

Allgemein wäre vorauszuschicken, daß wir nur sehr wenige Farbstoffe gefunden haben, die makroskopisch unter Harnstoff eine verfärbte Anfärbbarkeit des Zentralnervensystems ergeben haben. Die ganzen sogenannten neurotropen Farbstoffe machen keinen Unterschied mit Ausnahme von Alizarin-Natrium. Neben diesem Farbstoff erwies sich noch Lichtgrün FS und Nilblau unter der Wirkung des Harnstoffs deutlich unterscheidbar gegenüber den Kontrolltieren.

Tabelle I.

Alizarin-Natrium[1]).

Versuch Nr.	Gew. in g	Farbstoffmenge in ccm mit u. ohne Harnstoff	Dauer d. Durchströmung	Makroskop. Färbung des Frosches	Färbung des Gehirns
123	59.0	100 ccm	1 Std. 55 Min.	schwach	Makroskop. ist das Gehirn mit H. stärker gefärbt, mikroskop. kein Unterschied.
123a	60.0	100 ccm +1 % H.	1 Std. 55 Min.	schwach	
125	71.0	100 ccm	1 Std. 55 Min.	schwach	Makroskop. ist das Gehirn mit H. stärker gefärbt, mikroskop. kein Unterschied.
125a	72.0	100 ccm +1 % H.	1 Std. 55 Min.	schwach	
127	48.0	100 ccm	1 Std. 40 Min.	schwach	Makroskop. ist das Gehirn mit H. stärker gefärbt, mikroskop. kein Unterschied.
127a	50.0	100 ccm +1 % H.	1 Std. 40 Min.	schwach	
129	54.0	100 ccm	1 Std. 50 Min.	schwach	Makroskop. ist das Gehirn mit H. stärker gefärbt, mikroskop. kein Unterschied.
129a	55.0	100 ccm +1 % H.	1 Std. 50 Min.	schwach	

[1]) 2.4 Alizarin+0,4 NaOH, dies heiß vom ungelösten abfiltriert, davon 10 ccm mit 90 ccm 1/10 verstärkter Ringerlösung verdünnen, wieder filtrieren.

Alizarin-Natrium.

Die Tabelle I zeigt die Versuchsreihen von Alizarin-Natrium. Die Farbstofflösung, die hier zur Anwendung kam, wurde auf folgende Weise hergestellt: 2,4 Alizarin + 0,4 g NaOH, dies wurde heiß vom ungelösten abfiltriert. Davon wurden 10 ccm wieder mit 90 ccm $^1/_{10}$ verstärkter Ringerlösung verdünnt, wieder filtriert und zur Durchströmung verwendet.

Wir fanden das Alizarin-Natrium makroskopisch deutlich sichtbar als rosa-gelbliche Färbung des Gehirns. Stets waren die Gehirne der Harnstofftiere makroskopisch viel intensiver gefärbt; mikroskopisch gelang es uns wieder nicht, den Farbstoff deutlich sichtbar zu machen.

Makroskopische Färbung des Frosches: Leber, Magen und Darm etwas violett gefärbt.

Tabelle II.

Nilblau[1]).

Versuch Nr.	Gew. in g	Farbstoffmenge i. ccm m. u. ohne Harnstoff	Dauer d. Durchströmung	Makroskop. Färbung des Frosches	Färbung des Gehirns
167	41.0	100 ccm	50 Min.	gefärbt	kleine hellblau gefärbte Zellen
167a	40.0	100 ccm +1% H.	50 Min.	stärker gefärbt	in beiden Versuchen. Makroskop. ist das Gehirn m. H. stärk. gefärbt
169	44.0	100 ccm	45 Min.	gefärbt	kleine hellblau gefärbte Zellen,
169a	42.0	100 ccm +1% H.	45 Min.	gefärbt	makroskop. ist das Gehirn mit H. stärker gef.
177	62.0	100 ccm	1 Std.	gefärbt	kleine hellblaue Zellen makroskop. ist das Geh. m. H. stärker gefärbt
177a	60.0	100 ccm +1% H.	1 Std.	stark gefärbt	

Makroskopische Färbung des Frosches: Haut und Zunge schwach, Leber, Magen, Darm und Niere stark blau gefärbt.

[1]) 0,04% Nilblau in Ringerlösung.

Auch bei Nilblau zeigte sich makroskopisch eine deutliche grünlich-blaue Färbung des Gehirns, die bei den Harnstofftieren sehr viel stärker in Erscheinung trat. Aber mikroskopisch boten sich dieselben Schwierigkeiten wie bei früheren Versuchen. In der dünneren Schicht der mikroskopischen Präparate läßt sich keine Farbe auffinden. Vereinzelt fanden sich kleine hellblau gefärbte Zellen, ohne daß bei Harnstofftieren mikroskopisch von einer eiwandfreien Vermehrung des Farbstoffs gesprochen werden kann. Auch die Aufstellung dickerer mikroskopischer Präparate durch Glycerin (bis zu 40 μ) brachte keine Bestätigung der makroskopischen Befunde. In der Hauptsache sahen wir auch bei dieser Farbe wie bei den anderen eine diffuse Anordnung des Farbstoffes.

Pyrrolblau.

Sowohl makroskopisch wie mikroskopisch gefärbte Gehirnpräparate. Mehrere Versuche mit Harnstoff sind makroskopisch und auch mikroskopisch deutlich stärker gefärbt, aber auch mehrere Versuche ohne Harnstoff ergaben makroskopisch und mikroskopisch genau das gegenteilige Bild und ein anderer Teil weist überhaupt keinen Unterschied in der Färbung auf.

Makroskopisch nimmt die Färbung vom Großhirn aus nach dem Kleinhirn zu immer mehr ab, sodaß das Rückenmark meist farblos ist; auch für die mikroskopische Untersuchung gilt dies.

Mikroskopisch findet man den Farbstoff in pünktchen- und kettenförmigen Zügen in den Gefäßen. Auch in den Endothelien der Gefäße konnte man granulierte Speicherung der Farbe nachweisen.

Makroskopisch blau gefärbt ist die Leber und Haut, sehr wenig Muskulatur und Darm.

Tabelle III.

Pyrrolblau.

Versuch Nr.	Gew. in g	Farbstoffmenge in ccm mit u. ohne Harnstoff	Dauer der Durchströmung	Makroskop. Färbung des Frosches	a. Makroskop. b. mikroskop. Färbung d. Gehirns
11	53	100 ccm	1 Std. 15 Min.	stark gefärbt	a. stark gef. b. gefärbt
11a	54	100 ccm +1% H.	1 Std. 15 Min.	gefärbt	a. gefärbt b. schwach
31	111	100 ccm	1 Std. 40 Min.	gefärbt	a. schwach b. schwach
31a	109	100 ccm +1% H.	1 Std. 40 Min.	gefärbt	a. schwach b. schwach
33	88	100 ccm	1 Std. 15 Min.	gefärbt	a. schwach b. farblos
33a	87	100 ccm +1% H.	1 Std. 15 Min.	gefärbt	a. schwach b. farblos
6	62	50 ccm	—	gefärbt	a. schwach b. schwach
7a	60	50 ccm +1% H.	—	gefärbt	a. gefärbt b. gefärbt
8	42	100 ccm	—	stark gefärbt	a. stark b. gefärbt
8a	43	100 ccm +2,5% H.	—	gefärbt	a. gefärbt b. schwach
10	48	50 ccm	—	gefärbt	a. gefärbt b. gefärbt
10a	49	50 ccm +2,5% H.	—	gefärbt	a. gefärbt b. gefärbt
59	67	150 ccm	—	gefärbt	a. gefärbt b. gefärbt
59a	66	150 ccm +0,5% H.	—	gefärbt	a. gefärbt b. gefärbt

Trypanblau ergibt wieder eine makroskopisch sichtbare Färbung des Gehirns ohne Unterschied zwischen Normal- und Harnstofftier. Die mikroskopischen Schnitte zeigen keine Farbe. Irgend eine Speicherung konnte in keinem Gehirn nachgewiesen werden.

Tabelle IV.

Trypanblau.

Versuch Nr.	Gew. in g	Farbstoffmenge in ccm mit u. ohne Harnstoff	Dauer d. Durchströmung	Makroskop. Färbung des Frosches	a. makroskop. b. mikroskop. Färb. des Gehirnes
51	46	100 ccm	1 Std.	stark gefärbt	a. stark b. sehr schw.
51a	45	100 ccm +1% H.	1 Std.	stark	a. gefärbt b. sehr schw.
52	54	100 ccm	50 Min.	stark gefärbt	a. stark b. farblos
52a	55	100 ccm +1% H.	50 Min.	stark gefärbt	a. gefärbt b. farblos
53	39	100 ccm	1 Std. 5 Min.	stark gefärbt	a. schwach b. farblos
53a	40	100 ccm +1% H.	1 Std. 5 Min.	stark gefärbt	a. schwach b. farblos

Makroskopische Färbung des Frosches: Bei dem mit Harnstoff durchströmten Tier ist die Haut und der Darm stärker gefärbt, die Muskulatur dagegen schwächer. Bei den Nieren besteht kein Unterschied, die Leberlappen sind verschieden gefärbt. Gehirn gefärbt, Nerven farblos.

Tabelle V.

Lichtgrün F. S.[1])

Versuch Nr.	Gew. in g	Farbstoffmenge in ccm mit u. ohne Harnstoff	Dauer d. Durchströmung	Makroskop. Färbung des Frosches	Färbung des Gehirns
75	38.0	100 ccm	1 Std. 5 Min.	stark	farblos
75a	38.0	100 ccm +1% H.	1 Std. 5 Min.	stark	farblos
77	39.0	100 ccm	1 Std. 15 Min.	stark	makroskop. ist das Geh. mit H. stärker gefärbt, mikroskop. kein Unterschied.
77a	39.0	100 ccm +1% H.	1 Std. 15 Min.	stark	
79	39.0	100 ccm	55 Min.	stark	makroskop. ist das Geh. mit H. stärker gefärbt, mikroskop. kein Unterschied.
79a	40.0	100 ccm +1% H.	55 Min.	stark	
81	42.0	100 ccm	1 Std. 5 Min.	stark	makroskop. ist das Geh. mit H. stärker gefärbt, mikroskop. kein Unterschied.
81a	44.0	100 ccm +1% H.	1 Std. 5 Min.		
14	40.0	100 ccm	—	stark	farblos
14a	40.0	100 ccm +1% H.	—	stark	farblos

Lichtgrün.

Wie die Tabelle zeigt, wiederholen sich auch mit dieser Farbe die Resultate der Alizarin-Natrium-Durchströmung. Die Harnstofftiere nehmen mehr auf, mikroskopisch lassen die Schnittpräparate einen diffusen grünen Schimmer erkennen ohne das makroskopische Bild deutlicher zum Ausdruck zu bringen.

Makroskopische Färbung des Frosches durch Lichtgrün: Haut, Muskulatur, Zunge, Leber, Magen und Darm gleich stark gefärbt.

[1]) Durchströmung von 0,04% Lichtgrün FS.

Tabelle VI.

Bismarckbraun.[1])

Versuch Nr.	Gew. in g	Farbstoffmenge in ccm mit u. ohne Harnstoff	Dauer d. Durchströmung	Makroskop. Färbung des Frosches	Färbung des Gehirns
35	62	100 ccm	1 Std. 30 Min.	schwach gefärbt	a. makrosk. sehr schw. b. mikroskop. farblos
35a	63	100 ccm +1% H.	1 Std. 30 Min.	schwach gefärbt	a. sehr schw. b. farblos
36	50	100 ccm	1 Std. 30 Min.	schwach gefärbt	a. sehr schw. b. sehr schw.
36a	50	100 ccm +1% H.	1 Std. 30 Min.	schwach gefärbt	a. sehr schw. b. sehr schw.
37	68	100 ccm	1 Std. 30 Min.	schwach gefärbt	a. sehr schw. b. farblos
37a	69	100 ccm +1% H.	1 Std. 30 Min.	schwach gefärbt	a. sehr schw. b. farblos
38	70	90 ccm	1 Std.	schwach gefärbt	a. sehr schw. b. sehr schw.
38a	69	90 ccm +1% H.	1 Std.	schwach gefärbt	a. sehr schw. b. farblos

Wie die Tabelle zeigt, färbt sich das Gehirn mit Bismarckbraun schwach an, ohne daß ein Unterschied bei den Harnstofftieren auch nur makroskopisch festzustellen ist. Die Durchströmungen kommen nach kurzer Zeit zum Stillstand und man findet in den Gefäßen kleine intensiv gefärbte Körnchen, teilweise die kleineren Gefäße gänzlich ausgefüllt. Es kommt allem Anschein nach zu einem Ausfallen des Farbstoffs.

Methylenblau.

Wechselnd waren die makroskopischen Befunde bei den Durchströmungen des Gehirnes mit Methylenblau.

Unter 6 Versuchen sahen wir zwar jedes Mal eine intensive Färbung des Gehirns, konnten aber darunter nur einmal eine deutliche makroskopische Mehrfärbung des Gehirns der Harnstofftiere feststellen, (Versuch 22/22 a), während der Ver-

[1]) 0.02% Bismarckbraun in Ringerlösung.

such 24/24 a ein gegenteiliges Resultat gezeitigt hat. Die anderen Versuche zeigen keinerlei Unterschied unter der Wirkung des Harnstoffs. Bei längerem Liegen an der Luft verstärkt sich die Farbe des Gehirns. In einem Versuch wurden die beiden Gehirne 24 Stunden in einer feuchten Kammer im Eisschrank aufbewahrt. Es zeigte sich dabei eine stark blaue Färbung beider

Tabelle VII.
Methylenblau[1]).

Versuch Nr.	Gew. in g	Farbstoffmenge in ccm mit u. ohne Harnstoff	Dauer d. Durchströmung	Makroskop. Färbung des Frosches	a. makroskop. b. mikroskop. Färbung d. Gehirns
43	49	100 ccm	2 Std.	stark	a. gefärbt b. farblos
43 a	52	100 ccm +1 % H.	2 Std.	stark	a. gefärbt b. farblos
44	60	100 ccm	1 Std. 15 Min.	stark	a. gefärbt b. farblos
44 a	59	100 ccm +1 % H.	1 Std. 15 Min.	stark	a. gefärbt b. farblos
46	62	100 ccm	1 Std. 30 Min.	stark	a. gefärbt b. farblos
46 a	65	100 ccm +1 % H.	1 Std. 30 Min.	stark	a. gefärbt b. farblos
47	67	100 ccm	1 Sdt. 15 Min.	stark	a. gefärbt b. farblos
47 a	68	100 ccm +1 % H.	1 Std. 15 Min.	stark	a. gefärbt b. farblos
22	40	100 ccm	—	stark	a. stark gef. b. sehr schw.
22 a	41	100 ccm +0,5 % H.	—	stark	a. stark gef. b. sehr schw. das Gehirn mit H. ist stärker gef.
24	35	50 ccm	—	stark	a. gefärbt b. farblos
24 a	36	50 ccm +0.5 % H.	—	stark	das Gehirn ohne H. ist stärker gefärbt

[1]) 0,02% Methylenblau in Ringerlösung.

Gehirne, die nunmehr mikroskopisch auch deutlich sichtbar wurde. Im mikroskopischen Präparat liegen jetzt verstreut kleinere und größere Tropfen, es konnte aber nicht sicher entschieden werden, ob es sich um gefärbte Zellkerne handelt. Vereinzelt fanden wir auch granulierte Speicherungen und zwar in der Form blaßblauer Zellen mit ganz intensiv blau gefärbten Körnchen. An diesen Präparaten konnte eine quantitativ vermehrte Farbstoffablagerung mikroskopisch unter der Wirkung des Harnstoffs aber nicht sicher gestellt werden.

Makroskopische Färbung des Frosches: Stark gefärbt sind Haut, Teile der Leber, Niere, weniger Magen und Darm.

Tabelle VIII.
Neutralrot.

Versuch Nr.	Gew. in g	Farbstoffmenge in ccm mit u. ohne Harnstoff	Dauer der Durchströmung	Makroskop. Färbung des Frosches	a. makroskop. b. mikroskop. Färbung d. Gehirns
13	83	100 ccm	40 Min.	gefärbt	a. stark b. schwach
13a	84	100 ccm +1% H.	40 Min.	schwach gefärbt	a. gefärbt b. schwach
14	108	100 ccm	45 Min.	gefärbt	a. stark b. schwach
14a	110	100 ccm +1% H.	45 Min.	schwach gefärbt	a. schwach b. gefärbt
17	75	100 ccm	55 Min.	gefärbt	a. schwach b. schwach
17a	74	100 ccm +1% H.	55 Min.	gefärbt	a. schwach b. schwach
23	50	50 ccm	——	schwach	a. stark b. schwach
23a	50	50 ccm +1% H.	——	schwach	a. stark b. schwach

Die 4 Versuche der Tabelle VIII zeigen in der Hauptsache eine makroskopische Färbung des Gehirns, die aber unter der Wirkung des Harnstoffs nicht stärker ist. Mikroskopisch ergibt sich ebenfalls kein Unterschied. Es handelt sich um eine diffuse Färbung, die nach dem Rückenmark zu an Intensität abnimmt. Eine Erscheinung, die wir an manchen Farbstoffen beobachten konnten.

Makroskopische Färbung des Frosches: gefärbt ist die Blase, der Darm, die Haut, wenig die Muskulatur, Zunge und Magen.

Neben den Farbstoffen der vorstehenden Tabellen fanden wir bei Cyanol, Toluidinblau und Methylviolett makroskopisch deutliche Anfärbbarkeit des Gehirns ohne Unterschied zwischen Kontroll- und Harnstofftier. Bei allen 3 Farbstoffen ließ sich aber auch mikroskopisch nichts sichtbar machen.

Bei Uranin, Fluoresccin-Natrium, Wasserblau 6B, Anilinblau, Azoblau, Haematoxilin und Indigocarmin war makroskopisch keine Färbung des Gehirns zu erzielen.

Erwähnt seien noch Versuche mit Perltusche, die auch im Gehirn eine starke Speicherung der Endothelien ergeben hatten, aber keinen Einfluß des Harnstoffs auf diese Speicherung erkennen ließen.

Betrachten wir unsere Versuchsreihen, so zeigt sich bei manchen Farbstoffen, daß unter der Wirkung des Harnstoffs eine bessere Anfärbbarkeit des Gehirns makroskopisch in Erscheinung tritt. Das gilt sowohl für die Injektionsversuche an der weißen Maus als auch bei den Durchströmungsversuchen mit Rana esculenta und Rana temporaria. Die Anzahl der Farbstoffe, die diese vermuteten Beziehungen zeigen, ist allerdings nicht sehr groß. Es sind einerseits bei der Maus zwei basische Farbstoffe, Methylenblau und Neutralrot, andererseits bei den Fröschen Alizarin-Natrium, Lichtgrün, Nilblau, also zwei saure und ein basischer Farbstoff. Einen Farbstoff aufzufinden, der nur unter Harnstoff eine Anfärbbarkeit des Gehirns zeigt, gelang nicht. Mit Ausnahme von Lichtgrün sind alle vier Farbstoffe als neurotrop bekannt, auch der saure Farbstoff Alizarin-Natrium. Es besteht aber innerhalb unserer geprüften Reihen keine strenge Gesetzmäßigkeit, auch nicht in Bezug auf die Neurotropie der Farbstoffe. Aber bei allen unseren Versuchen muß bedacht werden, daß eine relativ kurze Einwirkung der Farbstoffe den Versuchen zugrunde gelegt wurde, und das es nicht sich um sogenannte „hochgetriebene Tiere" handelt. Darin liegt unseres Erachtens auch die durchweg aufgetretene Schwierigkeit mikro-

skopisch den makroskopischen Befund sicher zu stellen, und zwar gerade in Bezug auf „Speicherung". Es lag aber nicht im Rahmen der Arbeit, für jeden geprüften Farbstoff eine genaues makroskopisches und mikroskopisches Material zu bringen, sondern es sollte nur die Frage entschieden werden: Gibt es Stoffe, die unter der Wirkung des Harnstoffs eine intensivere Anfärbbarkeit des Gehirns zeigen? Diese Frage kann durch unsere Versuchsreihen bejaht werden. Wir sehen also parallele Erscheinungen zu den Feststellungen von *Dellen* und *Utz*, die nachweisen konnten, daß Strychnin unter Harnstoff giftiger wirkt als ohne Harnstoff: zu den Versuchen von *Baur* und *Schumann*, die an der Blutliquorschranke des Kaninchens durch Farbstoffe die Permeabilitätssteigerung durch Harnstoff nachwiesen. Auch von anderer Seite sind mittlerweile ähnliche Feststellungen gemacht. So konnte *Keeser* 11) zeigen, daß gleichzeitige Injektion von Harnstoff die Wirkungsstärke des Morphins erhöht und den Versuchen von *Kohn* und *Costopanagiotis* 12) über die Toxizitätssteigerung von Digitalis liegt m. E. dieselbe Wirkung des Harnstoffs zugrunde. Späteren Versuchen soll eine genaue Auswertung des gesamten Organmaterials vorbehalten bleiben, insbesondere sollen auch die Zusammenhänge zwischen Vitalfärbung und Harnstoff geklärt werden.

Zusammenfassung.

1. Im Zusammenhang mit den Arbeiten von *Baur* und seinen Mitarbeitern zeigt sich, daß die gleichzeitige Injektion von Harnstoff bei einzelnen Farbstoffen zu einer verstärkten Färbung des Gehirns führt.

2. Bei intravenöser Injektion an der weißen Maus zeigen diese Erscheinungen Methylenblau, Neutralrot, bei Durchströmungsversuchen an Rana esculenta und Rana temporaria Alizarin-Natrium, Lichtgrün und Nilblau.

Herrn Professor Dr. *Baur* danke ich für Thema und Mithilfe bei der Arbeit.

Literaturverzeichnis.

1. *Mißfeld,* Inaugural-Dissertation, Kiel 1930.
2. *Fries,* Inaugural-Dissertation, Kiel 1930.
3. *Hermelingmeier,* Inaugural-Dissertation, Kiel 1930.
4. *Kroeplin,* Inaugural-Dissertation, Kiel 1930.
5. *Bakker,* Inaugural-Dissertation, Kiel 1930.
6. *Lorentz,* Inaugural-Dissertation, Kiel 1931.
7. *Fatheuer,* Inaugural-Dissertation, Marburg, 1933.
8. *Utz,* Inaugural-Dissertation, Kiel 1931.
9. *Dellen,* Inaugural-Dissertation, Kiel 1932.
10. *Baur* und *Schumann,* noch unveröffentlicht.
11. *Keeser,* Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol. Bd. 167, S. 267.
12. *Kohn* und *Costopanagiotis,* Kl. W. 1932. Nr. 37.
13. *Goldmann, E. E.,* Die äußere und innere Sekretion des gesamten Organismus im Lichte der vitalen Färbung. Tübingen 1909.
14. *Goldmann, E. E.,* Neue Untersuchungen über die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. Tübingen 1912.
15. *Goldmann, E. E.,* Vitalfärbung am zentralen Nervensystem. Berlin 1913, Abhandlungen der Königl. Preuß. Akademie der Wissenschaften.
16. *v. Möllendorff,* Ergebn. d. Physiologie, Spiro, 18. Jahrg. 1920.
17. *Schulemann,* Biochem. Zeitschrift, 80, 1917.

Lebenslauf.

Am 26. Juli 1909 wurde ich, *Karl-Ferdinand Hoffmann*, als Sohn des Studiendirektors *Hoffmann*, in Stargard/Pommern geboren. 3 Jahre besuchte ich die Vorschule und 9 Jahre das Gymnasium zu Belgrad a. d. Persante; dort erhielt ich auch das Zeugnis der Reife.

Dann studierte ich 3 Semester Zahnheilkunde in Jena und bestand dort am 30. Juli 1929 das zahnärztliche Vorexamen. Weitere 4 Semester hielt ich mich zum Studium in Kiel auf, wo ich am 17. November 1931 meine Approbation als Zahnarzt erhielt.

Meine akademischen Lehrer waren:

in Jena: *Klughart, Maurer, Sieverts, Skramlik, Wien*

in Kiel: *Baur, Diettrich, Hentze, Kuls, Puhl, Schultz, Tiemann, Weigmann*

in Marburg: *Baur.*